

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 février 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/09170 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C07K 7/00,
14/47, A61P 25/28

Manet, F-75013 Paris (FR). PROCHIAITZ, Alain
[FR/FR]; 8 rue Marie Pape-Carpentier, F-75006 Paris
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02174

(74) Mandataire: CABINET ORES; 6 avenue de Messine,
F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 28 juillet 2000 (28.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (national): CA, JP, US.

(26) Langue de publication: français

(84) États désignés (régional): brevet européen (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE).

(30) Données relatives à la priorité:
99/09929 30 juillet 1999 (30.07.1999) FR

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

— Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794
Cedex 16 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement):
ALLINQUANT, Bernadette [FR/FR]; 7 rue Edouard

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USES OF PEPTIDES DERIVED FROM THE CYTOPLASMIC DOMAIN OF THE AMYLOID PROTEIN PRECURSOR (APP)

(54) Titre: APPLICATIONS DE PEPTIDES ISSUS DU DOMAINE CYTOPLASMIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE (APP)

(57) Abstract: The invention concerns novel uses of peptides derived from the cytoplasmic domain of the amyloid protein precursor (APP); said peptides are in particular sequences including the membrane domain juxtaposed to the cytoplasmic domain of the amyloid protein precursor (APP) (one-letter code), selected in the group consisting of the sequences Y₁KQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:2), Y₁KKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:3) and Y₁KKKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:4), wherein Y₀ is nil or represents V, VV, VVE, VVEV or VVED and Y₁ represents an internalisation and addressing peptide, derived from the 3rd helix of homeodomains and structurally related peptides. The invention also concerns the use of a peptide comprising the membrane domain juxtaposed to the cytoplasmic domain of the amyloid protein precursor (APP), for selecting and screening products capable of inhibiting apoptosis.

(57) Abrégé: Nouvelles applications de peptides issus du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP); lesdits peptides sont notamment constitués par des séquences incluant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP) (code une lettre), sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences Y₁KQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:2), Y₁KKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:3) et Y₁KKKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:4), dans lesquelles Y₀ est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVED et Y₁ représente un peptide d'internalisation et d'adressage, issu de la 3^{ème} hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés. Utilisation d'un peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP), pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

WO 01/09170 A1

APPLICATIONS DE PEPTIDES ISSUS DU DOMAINE CYTOPLASMIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOÏDE (APP)

La présente invention est relative à de nouvelles applications de peptides issus du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP).
5

Le précurseur de la protéine amyloïde APP est une protéine de fonction inconnue, dont la forme neuronale comporte 695 acides aminés ; elle présente un seul domaine transmembranaire (positions 625-648) et un court domaine cytoplasmique de 47 acides aminés (positions 649-695), représenté dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1.
10

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif qui affecte de 1 à 6 % de la population âgée de plus de 65 ans. L'une de ses caractéristiques est la présence de plaques séniles qui contiennent du β -amyloïde (β A4 ou BAP), produit toxique dérivé de l'APP et constitué de peptides de 39 à 42 acides aminés, engendrés par clivage de l'APP par deux protéases, la β et la γ sécrétase. Par ailleurs, une troisième enzyme, dite α sécrétase clive l'APP entre les sites β et γ rendant donc impossible la formation du β A4 supposé pathogène. Aucune de ces sécrétases n'a été identifiée à ce jour, même si des suspicions légitimes pèsent sur la protéine PS1 (produit du gène Presenilin-1, muté dans des formes familiales de la maladie d'Alzheimer). En effet, PS1 pourrait être soit la γ sécrétase soit un de ses co-facteurs. Enfin, d'autres sites de clivage existent dans le domaine C-terminal dont le site des caspases (N. Barnes et al., J. Neuroscience, 1998, 18, 15, 5869-5880), entre les résidus aspartate et alanine de la SEQ ID NO:1 (positions 15 et 16). Il reste que les mécanismes responsables de la toxicité du β A4 ne sont pas connus et que la relation entre la présence du β A4 dans les plaques et la pathologie n'est pas élucidée. Il est probable que d'autres facteurs et/ou d'autres domaines de la molécule entrent également en jeu.
15
20
25

C'est la raison pour laquelle de nombreuses études ont essayé d'établir le rôle physiologique et/ou physiopathologique de l'APP et des différents produits de son métabolisme. En effet, le ligand physiologique – s'il existe – du domaine N-terminal n'a pas été identifié et les voies de signalisation sont encore mal définies. Une des stratégies d'accès à l'analyse de ces voies de signalisation est l'identification de partenaires moléculaires du domaine cytoplasmique.
30

Le domaine cytoplasmique de l'APP ainsi que différents peptides issus de ce domaine cytoplasmique ont en particulier été étudiés :

- les séquences YTSI, KKKQYTSIHG VVEV (SEQ ID NO:8), GYENPTY (SEQ ID NO:9) et NPTY ont été identifiées comme des signaux d'internalisation ; de manière plus précise, elles sont considérées comme des séquences de transcytose de l'APP entre les compartiments basolatéral et apical des cellules épithéliales MDCK (Haass et al., J. Cell Biol., 1995, 128, 4, 537-547 ; Lai et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 8, 3565-3573 ; Lai et al., J. Biol. Chem., 1998, 273, 6, 3732-3739) ;

- le domaine cytoplasmique C-terminal (APP-Cter) a été identifié comme :

. intervenant dans la régulation de l'activité GTPasique de la sous-unité α o de la protéine G hétérotrimérique (Brouillet et al., J. Neuroscience, 1999, 19, 5, 1717-1727) ;

. interagissant avec plusieurs protéines : Pat-1 interagit avec le domaine juxtamembranaire (KKKQYTSIHG) et avec le domaine C-terminal complet et interviendrait dans le transport d'APP le long des microtubules, vers la surface cellulaire (Zheng et al., PNAS, 1998, 95, 14745-14750) ; la sous-unité α o de la protéine G hétérotrimérique interagit avec la région médiane dudit domaine cytoplasmique C-terminal, au niveau du doublet d'histidines (HH) (Nishimoto et al., Nature, 1993, 362, 75-79) et la protéine Fe65 avec la région la plus distale du domaine APP-Cter (Fiore et al., J. Biol. Chem., 1995, 270, 52, 30853-30856).

Ces différents résultats montrent la complexité des mécanismes dans lesquels le précurseur de la protéine amyloïde (APP) est impliqué.

Les Inventeurs ont maintenant montré, que de manière surprenante, des peptides comprenant le domaine juxtamembranaire (positions 649-664) du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP), présentent, après internalisation dans des cellules, une activité apoptotique.

La présente invention a pour objet des peptides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des séquences incluant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP) (code une lettre), sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences Y₁KQYTSIHG Y₀ (SEQ ID

NO:2), Y₁KKQYTSIHGY₀ (SEQ ID NO:3) et Y₁KKKQYTSIHGY₀ (SEQ ID NO:4), dans lesquelles Y₀ est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y₁ représente un peptide d'internalisation et d'adressage issu de la 3^{ème} hélice des homéodomains et de peptides structurellement apparentés et répond de préférence à la séquence X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆, dans laquelle X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆ représentent chacun un acide α-aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X₆ représentant un tryptophane.

Parmi les séquences Y₁ préférées, on peut citer la séquence KQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:5).

Les peptides X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆ ont notamment été décrits dans la Demande Internationale WO 97/12912.

Les peptides selon l'invention provoquent l'apoptose des cellules dans lesquelles ils sont internalisés et peuvent avantageusement être utilisés pour sélectionner et cribler des produits aptes à inhiber l'apoptose cellulaire.

La présente invention a donc également pour objet l'utilisation d'un peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP), pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, le peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP) est associé à un peptide d'internalisation sélectionné dans le groupe constitué par des peptides aptes à passer la barrière hémato-encéphalique.

A titre d'exemples de peptides d'internalisation aptes à être mis en œuvre dans la présente invention, on peut citer :

- les peptides d'internalisation et d'adressage, issus de la 3^{ème} hélice des homéodomains et les peptides structurellement apparentés à ces derniers,

- les peptides issus de protéines virales : VP22 (G. Elliott et al., Cell, 1997, 88, 223-233 ; A. Prochiantz, Current Opinion in Cell Biology, 2000, 12, 399-406) ; les peptides issus du domaine de transduction de la protéine Tat du VIH (Schwarze SR et al., Science, 1999, 285, 5433, 1569-1572),

- ainsi que d'autres peptides tels que ceux décrits dans A. Prochiantz, 2000, précité ; M. Lindgren et al., TIPS, 2000, 21, 99-103 ou C. Rousselle et al., Mol. Pharmacol., 2000, 57, 679-686 (peptides amphiphiles, peptides issus de séquences signal, transportan etc...).

5 De manière préférée, le peptide utilisé dans la présente invention est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre) $Y_1KQYTSIHG Y_0$ (SEQ ID NO:2), $Y_1KKQYTSIHG Y_0$ (SEQ ID NO:3) et $Y_1KKKQYTSIHG Y_0$ (SEQ ID NO:4), dans lesquelles Y_0 est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y_1 est nul ou représente un peptide d'internalisation
10 et d'adressage issu de la 3^{ème} hélice des homéodomains et de peptides structurellement apparentés et répond de préférence à la séquence $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$, dans laquelle $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}$ représentent chacun un acide α -aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X_6 représentant un tryptophane.

15 Le peptide de SEQ ID NO:2 dans laquelle Y_1 est nul et Y_0 est nul est dénommé peptide G (voir également figure 1).

Le peptide de SEQ ID NO:4 dans laquelle Y_1 est nul et Y_0 représente VVEVD est dénommé Jcasp (ou Gcasp).

20 La présente invention a également pour objet l'utilisation de cellules, dans lesquelles un peptide tel que défini ci-dessus a été internalisé, pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage et de sélection de produits aptes à inhiber l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comprend :

25 - la mise en contact de l'inhibiteur potentiel avec une cellule dans laquelle un peptide tel que défini ci-dessus a été internalisé et

- la mesure du clivage de l'ADN (révélé notamment par le marquage TUNEL) ou de l'actine (révélé par exemple par un anticorps anti-fractine) ou la mesure de la sous-unité p20 de la caspase 3 (par exemple par marquage spécifique).

30 La présente invention a en outre pour objet l'utilisation d'un peptide tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un médicament anti-cancéreux.

La présente invention a également pour objet des peptides caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre) $Y_1KKQYTSIHGGY_0$ (SEQ ID NO:2) et $Y_1KKQYTSIHGGY_0$ (SEQ ID NO:3), dans lesquelles Y_0 est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y_1 est nul, et par le peptide de formule $Y_1KKKQYTSIHGGY_0$ (SEQ ID NO:4), dans lequel Y_0 représente VVEVD et Y_1 est nul.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente la séquence du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP) : positions 649—695, ainsi que certains de ses fragments : peptide G : positions 651-659 ; peptide E : positions 663-671 ; peptide H : positions 680-688 ; peptide Jcasp : positions 649-664,

- les figures 2 et 3 représentent la quantification du clivage de l'ADN par la technique TUNEL 24 h après internalisation des peptides,

- les figures 4 et 5 représentent la quantification du clivage de l'actine par la caspase 3 à l'aide d'un anticorps anti-fractine,

- la figure 6 illustre la détection de la p20 dans un neurone par immunomarquage (flèche) (phosphatase alcaline) ; la p20 est présente dans tous les compartiments ; échelle : 10 μ m

- la figure 7 illustre l'activation de la p20 par le peptide Jcasp (2,4 μ M)

- la figure 8 illustre les résultats obtenus *in vivo* : diagrammes représentatifs (une expérience, un animal par condition) de la distribution des cellules positives à la fractine dans des coupes adjacentes. La valeur 0 est arbitrairement attribuée au site d'injection. Le peptide Jcasp montre un plus grand nombre de cellules positives à la fractine comparé au peptide J(Y \rightarrow D)casp ou au contrôle.

EXEMPLE 1: Matériel et Méthodes

1.1 Cultures neuronales primaires

Des neurones corticaux et corticostriataux sont préparés, comme décrit précédemment (Lafont et al., Development, 1992, 114, 17-29), à partir d'embryons de souris E14 ou d'embryons de rat E15.

Brièvement, les cellules dissociées sont étalées sur des plaques en plastique (plaques de type ELISA) revêtues de polyornithine à une densité de 5 000 cellules par puits et incubées dans un milieu convenable complétement en hormones, protéines et sels.

- 5 Pour vérifier l'internalisation du peptide étudié, les cellules sont étalées sur des lames en verre recouvertes de polyornithine, à une densité de 100 000 cellules par lame.

1.2 Préparation des peptides

- On utilise le vecteur V1 (Pénétratine ou P = KQIKIWFQNRRM
10 KWKK) (SEQ ID NO:5) comme peptide d'internalisation qui, après fusion génétique ou chimique à un cargo, permet sa translocation à travers la membrane plasmique et son adressage cytoplasmique et nucléaire.

Plusieurs peptides ont ainsi été préparés :

- . SEQ ID NO:5 + domaine cytoplasmique entier de l'APP (SEQ ID
15 NO:1).

. $Y_1KKKQYTSIHG Y_0$: SEQ ID NO:4 dans laquelle Y_0 est nul ou représente VVEVD (Jcasp) et Y_1 représente la SEQ ID NO:5 ; la partie en gras correspond au peptide G de la figure 1.

- . $Y_1KQYTSIHG Y_0$: SEQ ID NO:2 dans laquelle Y_0 est nul
20 (peptide G) et Y_1 représente la SEQ ID NO:5 ; la partie en gras correspond au peptide G de la figure 1.

. $Y_1KKQYTSIHG Y_0$: SEQ ID NO:3 dans laquelle Y_0 est nul et Y_1 représente la SEQ ID NO:5 ; la partie en gras correspond au peptide G de la figure 1.

- . SEQ ID NO:5 + domaine E (VDAAVTPEE, SEQ ID NO:6),
25 souligné dans la séquence selon la figure 1.

. SEQ ID NO:5 + domaine H (NGYENPTYK, SEQ ID NO:7), souligné dans la séquence selon la figure 1.

. SEQ ID NO:5 + peptide correspondant à la séquence MYC [EQKLISEED] (peptide Pmyc).

- 30 . SEQ ID NO:5 + peptide J(Y→D)casp.

Le peptide G correspond à un signal de transcytose et comprend un résidu tyrosine (Y), le peptide a également été internalisé soit après phosphorylation

de cette tyrosine (Y-P) soit après sa substitution par une alanine (Y→A) ou un aspartate (Y→D). Les deux substitutions abolissent totalement les effets physiologiques de G alors que la phosphorylation les amenuise sans les abolir. Dans la mesure où Y→D mime une phosphorylation on peut proposer comme hypothèse parcimonieuse que la tyrosine est nécessaire, mais que sa phosphorylation ne l'est probablement pas, l'effet intermédiaire de Y-P étant alors explicable par la désphosphorylation du peptide dans la cellule. On ne peut cependant pas exclure que la phosphorylation est nécessaire mais que la substitution Y→D n'est pas suffisante pour la mimer.

Ces différents peptides sont synthétisés chimiquement (pureté 95-98 %, Synthem, France) avec (Jcasp et J(Y→D)casp) ou sans biotine N-terminale et bras espaceur d'acide aminopentanoïque (Derossi et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 10444-10450).

Il y a lieu de noter que dans la mesure où les 2 derniers acides aminés de la séquence SEQ ID NO:5 sont des lysines (KK), le peptide G (KQYTSIHG) se trouve artificiellement rallongé de 2 acides aminés.

1.3 Internalisation des peptides recombinants dans des neurones

Les conditions d'internalisation sont les mêmes que celles décrites dans la Demande internationale WO 97/12912.

Tous les peptides sont ajoutés aux cellules deux heures après l'étalement de ces dernières. L'internalisation est vérifiée par microscopie confocale après immunomarquage (Pmyc) ou détection de la biotine (Jcasp et ses variants).

L'internalisation et la stabilité intracellulaire de Jcasp, Pmyc et J(Y→D)Casp sont identiques. Les inhibiteurs irréversibles de la caspase zVAD-fmk (100 µM) et zDEVD-fmk (200 µM) (Calbiochem, France) sont ajoutés 1 heure avant l'addition du peptide.

1.4 Immunocytochimie et quantification des cellules apoptotiques

Les cellules apoptotiques sont détectées par marquage TUNEL (kits à la fluorescéine ou à la phosphatase alcaline) comme décrit par le fournisseur (Roche diagnostics, France).

Pour l'immunodétection de la fractine ou de la sous-unité p20 de la caspase 3 (Pharmingen), les cellules sont fixées au paraformaldéhyde à 4 % (30 minutes, à température ambiante), lavées trois fois avec du PBS et saturées 1 heure à

37°C avec du sérum de veau fœtal à 10 % (FCS) dans du PBS contenant 0,2 % de Triton X 100.

Des anticorps primaires purifiés et dirigés contre la fractine ou la p20 sont dilués au 1/2000 et au 1/500 respectivement (dans du PBS-FCS), incubés une nuit à 4°C, lavés trois fois et incubés avec des anticorps anti-lapin biotinylés.

La détection est réalisée à l'aide du kit d'amplification phosphatase alcaline (Vector, France).

Pour chaque condition, 600 à 800 cellules sont comptées trois fois.

L'analyse statistique est réalisée avec ANOVA et test de Scheffé.

10 1.5 Tests in vivo

1 µl (0,2 µl/min.) de 2,7 µM de Jcasp (n=8), J(Y→D)Casp (n=6) ou de PBS (n=3) est injecté stéréotaxiquement dans le cortex de souris adultes aux coordonnées A=0, L=2 et D=1,5 (Atlas du cerveau de souris par KBJ Franklin et G.Paxinos, *Academic Press*). 24 heures après, les animaux sont sacrifiés, perfusés avec du paraformaldéhyde à 4 % et les cerveaux sont extraits et cryoprotégés.

Des coupes congelées (16 µm d'épaisseur) sont préparées et utilisées pour une détection TUNEL ou par immunocytochimie de la fractine, en utilisant l'anticorps primaire purifié (dilution au 1/100^{ème} dans du PBS-FCS) sans amplification et un anticorps secondaire anti-lapin marqué au Cy3 et dilué au 1/400^{ème} (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.). Le nombre de cellules positives à la fractine est compté sur des coupes adjacentes. L'analyse statistique est réalisée par ANOVA et test de Fischer.

EXEMPLE 2 : Résultats in vitro

2.1. Induction d'une apoptose neuronale

25 L'internalisation du domaine C-ter entier (APP-Cter) n'est pas toxique mais a, cependant, un effet négatif sur la croissance neuritique. L'internalisation des peptides E et H est sans effet alors que celle du peptide G, à des concentrations inférieures au µM reproduit les effets du domaine C-terminal intact.

30 Le résultat le plus intéressant est que le peptide G, à des concentrations de l'ordre de 1 à 1,5 µM ou le peptide Jcasp à des concentrations de 1,2 à 2,4 µM entraîne la mort des neurones et que cette mort correspond à un processus apoptotique, donc régulé.

Le caractère apoptotique de la mort provoquée par l'internalisation du peptide G ou du peptide Jcasp (figures 2-7) est démontré par la fragmentation de l'ADN, mise en évidence par la méthode dite « TUNEL » (figures 2 et 3), et par l'activation des caspases (figures 4-7). L'activation des caspases est démontrée par l'apparition de formes clivées de l'actine et par le blocage de l'apoptose par des inhibiteurs de caspase à large spectre d'activité (inhibiteur de caspase 1, 3, 4 et 7) comme le zVAD ou le zDEVD-fmk (figures 4, 5 et 7), plus spécifique de la caspase 3.

Les figures 2 et 3 illustrent la quantification du clivage de l'ADN par la technique TUNEL 24h après internalisation des peptides.

Le peptide G a été internalisé à 2 concentrations (1X et 2X) et le peptide Gcasp (ou Jcasp) à la concentration 1X, en présence ou en l'absence de l'inhibiteur de caspases zVAD.

Chaque condition a été testée en triple. Le pourcentage de cellules positives a été évalué après 24h, par comptage d'environ 1000 cellules par puits. Le graphe indique une augmentation significative du clivage de l'ADN en présence du peptide G seul (concentration 1X : $p < 0.0001$; concentration 2X : $p < 0.0001$) et du peptide Jcasp (ou Gcasp) (KKKQYTSIHGVEVD) (SEQ ID NO:4 dans laquelle $Y_0 = VVEVD$ et $Y_1 = SEQ ID NO:5$) (concentration 1X : $p < 0.0001$). Le ZVAD inhibe cette augmentation du clivage.

Le peptide Jcasp induit une apoptose neuronale. Deux heures après l'étalement sur plaque, le peptide Jcasp est ajouté aux neurones corticaux de rat E15 et la mort cellulaire est évaluée par effet TUNEL, 24 heures plus tard. La figure 3 montre que le peptide Jcasp (1,2 et 2,4 μM) conduit une fragmentation de l'ADN.

La substitution de la tyrosine par un aspartate diminue, comme pour le peptide G la mort cellulaire tandis que l'internalisation d'un peptide myc sans relation avec APP et lié à la pénétratine (Pmyc) n'a pas d'effet sur le nombre de cellules positives obtenues par la méthode TUNEL.

Dans la mesure où la fragmentation de l'ADN suggère une apoptose, la même expérience a été réalisée en présence de zDEVD-fmk qui inhibe la caspase 3. A 200 μM , zDEVD-fmk a un faible effet sur la mort cellulaire basale et inhibe la fragmentation de l'ADN induite par le peptide Jcasp à 1,2 μM et 2,4 μM (figure 3).

Des inhibitions similaires sont obtenues avec l'inhibiteur zVAD-fmk (100 μ M), (voir figure 2).

Le peptide Jcasp non lié à la pénétratine (séquence d'internalisation de SEQ ID NO:5) qui n'est donc pas internalisé, n'induit pas de fragmentation de l'ADN.

2.2. L'induction de l'apoptose est liée à l'activation de la caspase 3

- quantification du clivage de l'actine par la caspase 3 par un anticorps anti-fractine

Les figures 4 et 5 illustrent la quantification du clivage de l'actine par la caspase 3 à l'aide de l'anticorps anti-fractine, par immunocytochimie après fixation des cellules au paraformaldéhyde (F. Yang et al., Am. J. Pathol., 1998, 152, 2, 379-389). L'anticorps anti-fractine reconnaît spécifiquement l'actine clivée par la caspase 3. Le pourcentage de neurones positifs pour la fractine a été déterminé après 24h d'internalisation des peptides, par comptage d'environ 1000 cellules par puits en triple. En présence des peptides G (KQYTSIHG = SEQ ID NO:2 dans laquelle Y_1 représente un peptide d'internalisation et d'adressage, tel que défini ci-dessus et Y_0 est nul) (1X et 2X) et Gcasp (ou Jcasp) (KKKQYTSIHGVVEVD = SEQ ID NO:4 dans laquelle Y_1 représente un peptide d'internalisation et d'adressage, tel que défini ci-dessus et Y_0 VVEVD) (1X), il existe une augmentation significative du clivage par l'actine (G1X : $p < 0.0003$; G2X : $p < 0.0001$; Gcasp1X : $p < 0.0001$). Le zVAD seul inhibe tout clivage endogène des neurones par les caspases et inhibe significativement l'augmentation de ce clivage par G1X, G2X et Gcasp1X (G1X/zVADG1X : $p < 0.0001$; G2X/zVADG2X : $p < 0.0001$; Gcasp/zVADGcasp : $p < 0.0001$), même si l'inhibition n'est pas totale.

La figure 5 montre que le peptide Jcasp induit un clivage de l'actine. Elle montre également que le peptide J(Y \rightarrow D)casp est peu actif et que l'inhibiteur zDEVD-fmk, plus spécifique de la caspase 3, inhibe le clivage de l'actine induit par le peptide Jcasp.

- quantification du clivage de l'actine par la caspase 3 par mesure de la p20

Pour vérifier que la caspase 3 est effectivement impliquée dans l'apoptose provoquée par le peptide Jcasp, le fait que cette enzyme (caspase 3) est

synthétisée sous la forme d'un propeptide (37 kDa), qui après stimulation, génère une sous-unité active de 17-22 kDa (p20) est utilisé.

L'immunoréactivité pour p20 est examinée dans des neurones embryonnaires corticaux de souris cultivés pendant 24 heures en présence de plusieurs peptides. La figure 6 illustre l'immunoréactivité de la protéine p20 et la figure 7 quantifie l'induction de la p20.

Le peptide Jcasp (2,4 μ M) induit une maturation de la p20 ; on obtient un effet significativement moindre avec le peptide J(Y→D)casp, confirmant l'importance du résidu tyrosine dans l'induction de la caspase 3.

L'inhibiteur zDEVD-fmk décroît de manière significative l'activation de la p20, suggérant que l'apoptose induite par le peptide Jcasp implique la maturation de la caspase 3.

Les Inventeurs ont donc bien montré le caractère pro-apoptotique du peptide G internalisé grâce à sa liaison au vecteur V1.

Une telle propriété est d'intérêt pour les raisons suivantes :

1. Le domaine C-terminal entier n'est pas pro-apoptotique
2. Il existe un site de clivage par les caspases entre les résidus aspartate (D) et alanine (A) marqués en gras dans la séquence de l'APP-Cter (figure 1).

On peut donc émettre l'hypothèse que le clivage entre D et A démasque une séquence KKKQYTSIHGVVEVD (= SEQ ID NO:4, dans laquelle Y₁ est nul est Y₀ représente VVEVD) à activité apoptotique. Ceci est particulièrement important car cela met en évidence un mécanisme impliqué dans la perte neuronale qui accompagne des démences de type Alzheimer.

Avoir identifié un peptide dérivé de l'APP correspondant à un domaine, normalement exposé après clivage *in vivo* et capable de provoquer l'entrée des cellules en apoptose, a comme premier avantage de proposer un mécanisme original susceptible d'éclairer certains aspects de la pathologie d'Alzheimer et donc de découvrir des voies thérapeutiques nouvelles (mise au point d'inhibiteurs).

Par ailleurs la liaison de la séquence G au vecteur V1 permet de fabriquer un peptide qui, une fois internalisé par les neurones en culture, provoque leur apoptose. Du fait des propriétés de V1, l'entrée se fait dans 100% des cellules

quel que soit leur degré de maturation *in vitro* et ces cellules sont normales (cultures primaires).

L'aspartate en position 664 correspond au site de clivage de la caspase ; le peptide selon l'invention, lorsqu'il est internalisé dans des cellules neuro-
5 nales, active la caspase 3, provoque le clivage de l'actine au niveau d'un site sensible à la caspase et induit la fragmentation de l'ADN.

De manière surprenante, les peptides conformes à l'invention, qui ne comprennent pas le BAP présentent ainsi des propriétés pro-apoptiques tant *in vitro* qu'*in vivo*.

10 **EXEMPLE 3 : Résultats *in vivo***

Les résultats *in vitro* (voir Exemple 2) démontrent que l'internalisation de Jcasp par les neurones corticaux de souris ou de rat provoque une apoptose par activation d'une caspase et suggèrent que la caspase 3 est l'une des caspases activées.

15 Pour vérifier si le peptide Jcasp est également actif *in vivo* et dans le cerveau adulte, 1 µl de peptide Jcasp, de peptide J(Y→D)casp (chacun à 2,7 µM dans un tampon salin) ou de tampon salin est injecté dans le cortex cérébral de souris. 24 heures plus tard, le nombre de cellules positives à la fractine est quantifié de chaque côté du site d'injection.

20 La figure 8 illustre les résultats obtenus. Bien que des variations aient été observées entre les différentes expériences, toutes donnent des résultats similaires montrant un effet important et spécifique du peptide Jcasp sur le nombre de cellules positives à la fractine (moyenne ± SEM : Jcasp (8 animaux), 40,7 ± 10,9 ; J(Y→D)casp (6 animaux), 13 ± 3,2 ; contrôle (3 animaux) : 8 ± 8 ; Jcasp vs contrôle :
25 p<0,05 ; Jcasp vs J(Y→D)casp : p<0,04 ; contrôle vs J(Y→D)casp : NS).

Des applications *in vivo*, avec perfusion du peptide à l'aide de mini-pompes, sont aussi possibles.

A partir de là, ce système constitue un test rapide et simple pour cribler des bibliothèques de produits agissant spécifiquement sur la mort apoptotique
30 induite par ce peptide et inoffensif sur d'autres modèles d'apoptose.

L'identification de telles substances est donc très utile pour la mise au point de traitements de l'apoptose accompagnant la maladie d'Alzheimer.

REVENDECATIONS

- 1°) Peptides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des séquences incluant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (BAPP) (code une lettre), sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences Y₁KQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:2), Y₁KKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:3) et Y₁KKKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:4), dans lesquelles Y₀ est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y₁ représente un peptide d'internalisation et d'adressage, issu de la 3^{ème} hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés.
- 2°) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide d'internalisation et d'adressage répond à la séquence X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆, dans laquelle X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆ représentent chacun un acide α-aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X₆ représentant un tryptophane.
- 3°) Peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisés en ce que la séquence Y₁ correspond à la séquence KQIKIWFQNRMRMKWKK (SEQ ID NO:5).
- 4°) Utilisation d'un peptide comprenant le domaine juxtamembranaire du domaine cytoplasmique du précurseur de la protéine amyloïde (APP), pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.
- 5°) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit peptide est associé à un peptide d'internalisation sélectionné dans le groupe constitué par les peptides d'internalisation aptes à passer la barrière hémato-encéphalique.
- 6°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 4 à 5, caractérisée en ce que ledit peptide est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre) Y₁KQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:2), Y₁KKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:3) et Y₁KKKQYTSIHGGY₀ (SEQ ID NO:4), dans lesquelles Y₀ est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y₁ est nul ou représente un peptide d'internalisation et d'adressage, issu de la 3^{ème} hélice des homéodomaines et de peptides structurellement apparentés.
- 7°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée en ce que ledit peptide d'internalisation répond à la séquence

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}X_{16}$, dans laquelle $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7, X_8, X_9, X_{10}, X_{11}, X_{12}, X_{13}, X_{14}, X_{15}, X_{16}$ représentent chacun un acide α -aminé, 6 à 10 d'entre lesdits acides aminés étant hydrophobes et X_6 représentant un tryptophane.

5 8°) Utilisation de cellules, dans lesquelles un peptide tel que défini aux revendications 4 à 7, a été internalisé, pour la sélection et le criblage de produits aptes à inhiber l'apoptose.

9°) Procédé de criblage et de sélection de produits aptes à inhiber l'apoptose, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - la mise en contact de l'inhibiteur potentiel avec une cellule dans laquelle un peptide tel que défini aux revendications 4 à 7, a été internalisé et

- la mesure du clivage de l'ADN ou de l'actine ou la mesure de la sous-unité p20 de la caspase 3.

10°) Utilisation d'un peptide tel que défini aux revendications 4 à 7, pour la préparation d'un médicament anti-cancéreux.

15 11°) Peptides, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences (code une lettre) $Y_1KQYTSIHG Y_0$ (SEQ ID NO:2) et $Y_1KKQYTSIHG Y_0$ (SEQ ID NO:3), dans lesquelles Y_0 est nul ou représente V, VV, VVE VVEV ou VVEVD et Y_1 est nul, et par le peptide de formule $Y_1KKKQYTSIHG Y_0$ (SEQ ID NO:4), dans lequel Y_0 représente VVEVD et Y_1 est
20 nul.

1/4

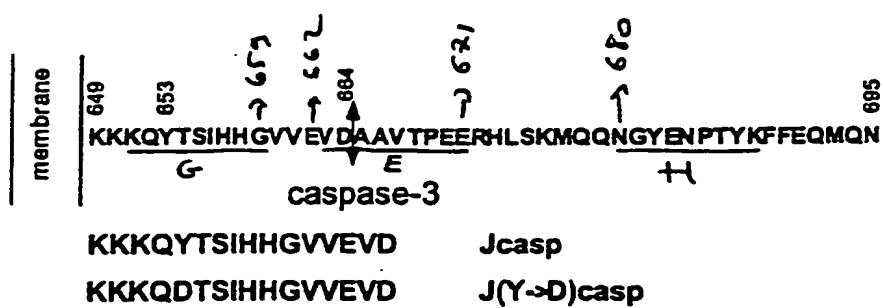


FIGURE 1

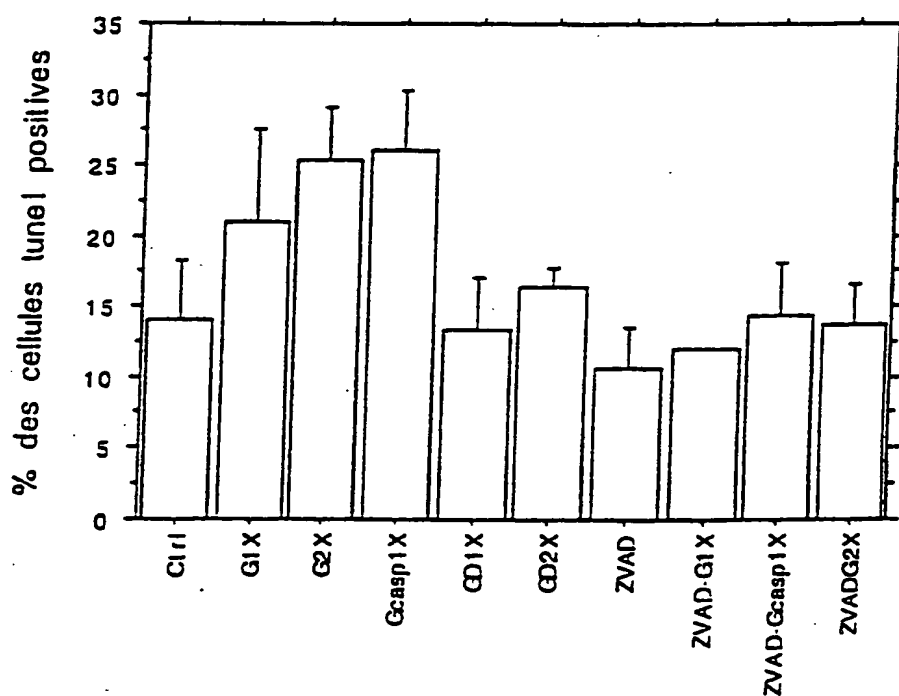


FIGURE 2

2/4

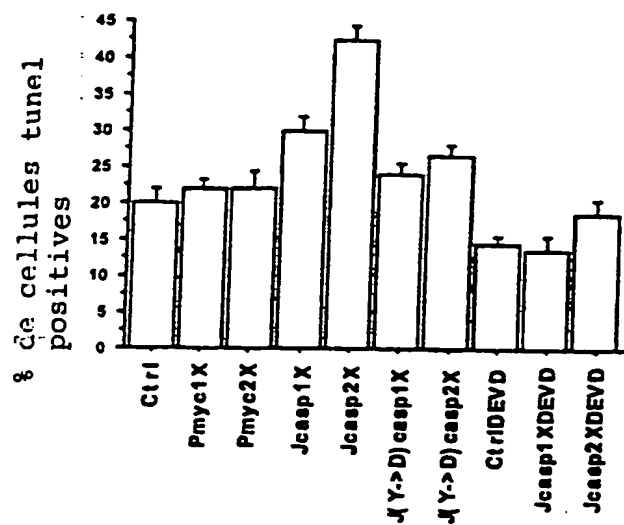


FIGURE 3

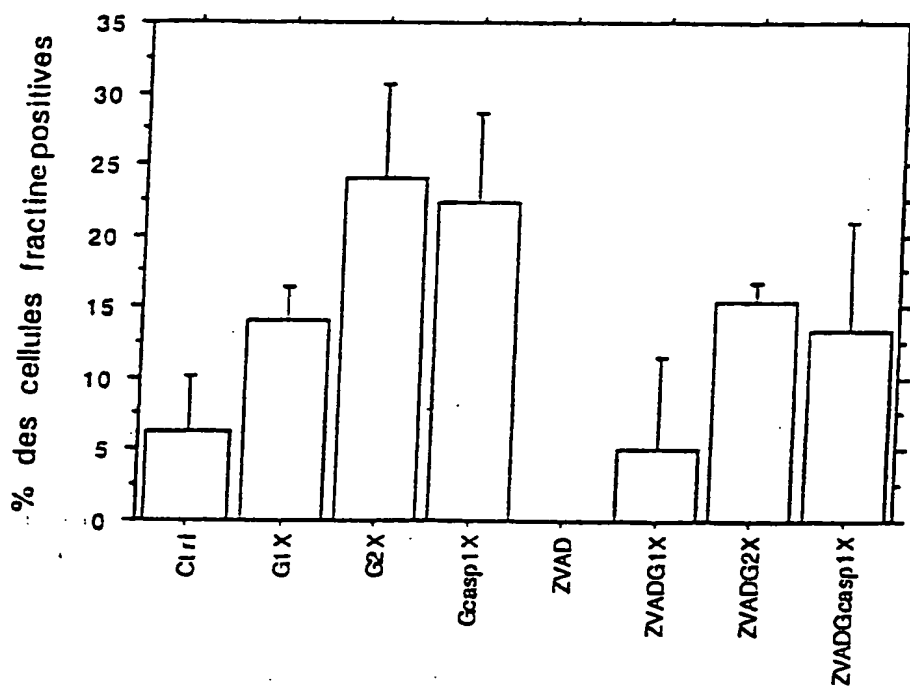


FIGURE 4



FIGURE 6

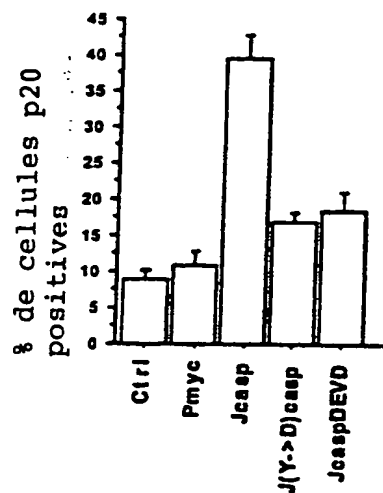


FIGURE 7

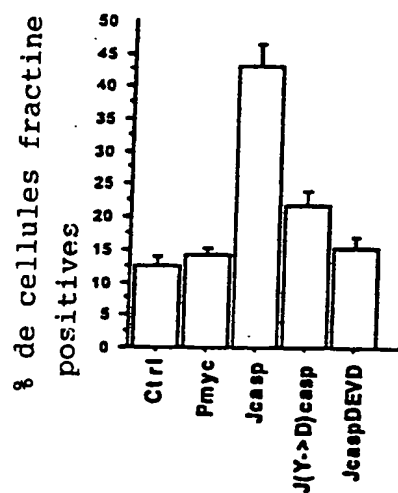


FIGURE 5

4 / 4

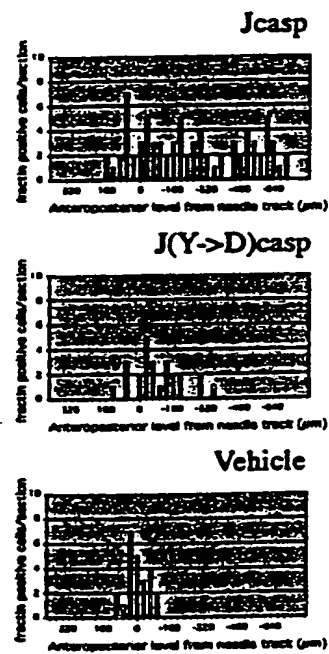


FIGURE 8

LISTE DE SEQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE -CNRS
ALLINQUANT Bernadette
PROCHIAANTZ Alain

<120> NOUVELLES APPLICATIONS DE PEPTIDES ISSUS DU DOMAINE
CYTOPLASMIQUE DU PRECURSEUR DE LA PROTEINE AMYLOIDE.

<130> BLOcp644PCT45

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 47

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp
1 5 10 15

Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn
20 25 30

Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Pro Pro Glu Gln Met Gln Asn
35 40 45

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Y1 Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0
1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Y1 Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Y1 Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Y0
1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys
1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val
1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/02174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K7/00 C07K14/47 A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, STRAND, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 652 092 A (VITEK MICHAEL PETER ET AL) 29 July 1997 (1997-07-29) abstract * description *	1-11
Y	WO 98 38861 A (SHELANSKI MICHAEL L ;UNIV COLUMBIA (US); TROY CAROL M (US)) 11 September 1998 (1998-09-11) abstract page 39 claim 5	1-11
A	WO 94 28412 A (MIRIAM HOSPITAL) 8 December 1994 (1994-12-08) abstract page 20, line 28 - line 33 page 43 claim 5	1,5,6 5
Y		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 November 2000

Date of mailing of the international search report

04/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/02174

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 07296 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 15 April 1993 (1993-04-15) abstract * description * figure 1 ----	1,5,6
A	US 5 703 209 A (VITEK MICHAEL PETER ET AL) 30 December 1997 (1997-12-30) abstract * description * figures 7A-Q,,9B ----	1,5,6
A	US 5 656 477 A (VITEK MICHAEL PETER ET AL) 12 August 1997 (1997-08-12) abstract * description * figure 7 ----	1,5,6
A	WO 98 28334 A (BANDARA LASANTHA RANASINGHE ;THANGUE NICHOLAS BARRIE (GB); PROLIFI) 2 July 1998 (1998-07-02) abstract page 5 -----	1-3,7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02174

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5652092	A	29-07-1997	US 5656477 A	12-08-1997
			US 5693478 A	02-12-1997
			US 5703209 A	30-12-1997
			AU 3835893 A	04-11-1993
			CA 2095421 A	02-11-1993
			EP 0584452 A	02-03-1994
			JP 7132094 A	23-05-1995
			NZ 247499 A	26-04-1996
			ZA 9303084 A	24-11-1993
WO 9838861	A	11-09-1998	US 5929042 A	27-07-1999
			AU 6345498 A	22-09-1998
WO 9428412	A	08-12-1994	AU 7043894 A	20-12-1994
WO 9307296	A	15-04-1993	AU 2765992 A	03-05-1993
			US 5879883 A	09-03-1999
US 5703209	A	30-12-1997	US 5656477 A	12-08-1997
			US 5652092 A	29-07-1997
			US 5693478 A	02-12-1997
			AU 3835893 A	04-11-1993
			CA 2095421 A	02-11-1993
			EP 0584452 A	02-03-1994
			JP 7132094 A	23-05-1995
			NZ 247499 A	26-04-1996
			ZA 9303084 A	24-11-1993
US 5656477	A	12-08-1997	US 5652092 A	29-07-1997
			US 5693478 A	02-12-1997
			US 5703209 A	30-12-1997
			AU 3835893 A	04-11-1993
			CA 2095421 A	02-11-1993
			EP 0584452 A	02-03-1994
			JP 7132094 A	23-05-1995
			NZ 247499 A	26-04-1996
			ZA 9303084 A	24-11-1993
WO 9828334	A	02-07-1998	AU 5330498 A	17-07-1998
			EP 0956299 A	17-11-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema internationale No

PCT/FR 00/02174

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K7/00 C07K14/47 A61P25/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, STRAND, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 652 092 A (VITEK MICHAEL PETER ET AL) 29 juillet 1997 (1997-07-29) abrégé * description *	1-11
Y	WO 98 38861 A (SHELANSKI MICHAEL L ; UNIV COLUMBIA (US); TROY CAROL M (US)) 11 septembre 1998 (1998-09-11) abrégé page 39 revendication 5	1-11
A	WO 94 28412 A (MIRIAM HOSPITAL) 8 décembre 1994 (1994-12-08) abrégé page 20, ligne 28 - ligne 33 page 43 revendication 5	1,5,6
Y		5
	--- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE :

Dema internationale No

PCT/FR 00/02174

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 93 07296 A (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION) 15 avril 1993 (1993-04-15) abrégé * description * figure 1	1,5,6
A	US 5 703 209 A (VITEK MICHAEL PETER ET AL) 30 décembre 1997 (1997-12-30) abrégé * description * figures 7A-Q,,9B	1,5,6
A	US 5 656 477 A (VITEK MICHAEL PETER ET AL) 12 août 1997 (1997-08-12) abrégé * description * figure 7	1,5,6
A	WO 98 28334 A (BANDARA LASANTHA RANASINGHE ;THANGUE NICHOLAS BARRIE (GB); PROLIFI) 2 juillet 1998 (1998-07-02) abrégé page 5	1-3,7-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema Internationale No

PCT/FR 00/02174

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5652092 A	29-07-1997	US 5656477 A US 5693478 A US 5703209 A AU 3835893 A CA 2095421 A EP 0584452 A JP 7132094 A NZ 247499 A ZA 9303084 A	12-08-1997 02-12-1997 30-12-1997 04-11-1993 02-11-1993 02-03-1994 23-05-1995 26-04-1996 24-11-1993
WO 9838861 A	11-09-1998	US 5929042 A AU 6345498 A	27-07-1999 22-09-1998
WO 9428412 A	08-12-1994	AU 7043894 A	20-12-1994
WO 9307296 A	15-04-1993	AU 2765992 A US 5879883 A	03-05-1993 09-03-1999
US 5703209 A	30-12-1997	US 5656477 A US 5652092 A US 5693478 A AU 3835893 A CA 2095421 A EP 0584452 A JP 7132094 A NZ 247499 A ZA 9303084 A	12-08-1997 29-07-1997 02-12-1997 04-11-1993 02-11-1993 02-03-1994 23-05-1995 26-04-1996 24-11-1993
US 5656477 A	12-08-1997	US 5652092 A US 5693478 A US 5703209 A AU 3835893 A CA 2095421 A EP 0584452 A JP 7132094 A NZ 247499 A ZA 9303084 A	29-07-1997 02-12-1997 30-12-1997 04-11-1993 02-11-1993 02-03-1994 23-05-1995 26-04-1996 24-11-1993
WO 9828334 A	02-07-1998	AU 5330498 A EP 0956299 A	17-07-1998 17-11-1999